Ueber den zeitlichen Ablauf der Haemolyse bei Einwirkung fluoreszierender Substanzen im Lichte.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

in der

gesamten Medizin,

verfasst und einer

hohen medizinischen Fakultät

der

Kgl. Bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Otto Harzbecker,
Medizinalpraktikant.

München 1908.
Kgl. Hof-Buchdruckerei Kastner & Callwey.

Ueber den

zeitlichen Ablauf der Haemolyse bei Einwirkung fluoreszierender Substanzen im Lichte.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

in der

gesamten Medizin,

verfasst und einer

hohen medizinischen Fakultät

der

Kgl. Bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Otto Harzbecker,
Medizinalpraktikant.

ACAD. LUGD. BAT. BIBL.

München 1908.
Kgl. Hof-Buchdruckerei Kastner & Callwey.

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München.

Referent:

Herr Professor Dr. v. Tappeiner.

Meinen lieben Eltern!

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548322_0164

I. EINLEITUNG.

Durch eine Reihe von Arbeiten aus dem hiesigen pharmakologischen Institute wurde ein Weg gezeigt, die biologisch nur äußerst schwach wirkenden, langwelligen Lichtstrahlen zu einer starken Wirkung zu bringen.

Setzt man nämlich Zellen in Lösungen, denen die Eigenschaft gemeinsam ist, in wässriger Lösung zu fluoreszieren, dem Lichte aus, so gehen dieselben nach kurzer Zeit zugrunde, während dieselben Lösungen im dunkeln nicht imstande sind, eine destruierende Wirkung zu entfalten.

Dieser Vorgang gilt sowohl für einzelne Zellen, von denen besonders die Protozoen (Paramaecium caudatum, Proteus vulgaris und Trypanosoma Bruceï), die roten Blutkörperchen, die Leuco- und Lymphocyten, die Flimmerepithelien und Bacterien zur Untersuchung herangezogen wurden, als auch für Zellkomplexe (Flimmerhaut des Frosches, glatte Muskelfasern usw.). Ebenso wie Zellen verhalten sich die Enzyme und Toxine, welche ebenfalls bei Gegenwart der fluoreszierenden

Stoffe durch die sichtbaren Lichtstrahlen stark angreifbar sind.

Der Mechanismus dieser, als photodynamische Erscheinung benannten Wirkung des Systems Licht + fluoreszierende Substanz ist zur Zeit noch nicht völlig aufgeklärt. Jedenfalls aber haben wir hierbei eine Absorption von Lichtstrahlen vor uns, wobei die strahlende Energie in eine andere Energie umgewandelt wird. Denn daß die Lichtabsorption allein nicht die Ursache sein kann, erhellt daraus, daß nicht fluorescierende, aber ähnlich absorbierende Farbstoffe nicht photodynamisch wirken können.

Außerdem haben wir in der photodynamischen Erscheinung einen Oxydationsproceß vor uns, da diese Erscheinung nur bei Anwesenheit von Sauerstoff erfolgen kann. Da die langwelligen Strahlen allein auch nur bei Sauersftoffanwesenheit deutlich nachweisbare Wirkung zu entfalten imstande sind, so ersieht man hieraus, daß die Wirkung des Lichtes allein und die des Systems Licht + fluoreszierende Substanz wesensgleich sind. Somit kann die photodynamische Erscheinung als eine Steigerung der einfachen Lichtwirkung — eine Sensibilisierung — aufgefaßt werden. Die fluorescierenden Substanzen sind somit die biologischen Sensibilisatoren. Es hat daher diese photodynamische Erscheinung Aehnlichkeit mit der Sensibilisierung photographischer Platten. V o g e l hat bekanntlich ein Verfahren gefunden, die langwelligen Strahlen, die auf

Bromsilbergelatine nur sehr schwach wirken, dadurch zu verstärken, daß den Platten gewisse, die langwelligen Strahlen absorbierende Substanzen zugesetzt wurden. Während aber biologisch nur die fluoreszierenden Stoffe sensibilisierend wirken, gehören zu den besten der photographischen Sensibilisatoren gerade nichtfluoreszierende Körper. Möglicherweise ist dieser Gegensatz nur scheinbar. G. C. Schmidt wies nämlich nach, daß eine Reihe von Stoffen, die in wässriger Lösung nicht fluoreszieren, diese Eigenschaft in fester Lösung gewinnen. Die Bromsilbergelatine könnte sich wie eine feste Lösung verhalten, wobei Stoffe, die in wässriger Lösung nicht fluoreszieren, Fluoreszenz erlangen. Ob diese Möglichkeit besteht, ist ein der experimentellen Prüfung zugängiges Problem.

Die nun folgende Untersuchung soll ein weiterer Beitrag zur Frage der Wirkungsweise sein.

Bereits Osthelder hat in dieser Richtung vor Jahresfrist Untersuchungen angestellt. Versuchsobjekt war hierbei Paramaecium caudatum. Der Gedankengang dabei war der, zu untersuchen, ob die fluoreszierende Substanz, nachdem sie längere Zeit im Dunkeln auf die Paramaecien eingewirkt hatte, in die Tiere eingedrungen war, und dieser dann im Zellinnern vorhandene Stoff noch photodynamisch zu wirken imstande ist. Es mußten also die Tiere zu diesem Zwecke sorgfältig vor der Belichtung von der sie umgebenden Lösung der

fluoreszierenden Stoffe getrennt werden. Dies gelang auch durch zwei Methoden. Die eine bestand darin, daß Osthelder die Lösung, fluoreszierende Substanz + Paramaecien centrifugierte. Dabei wurden die Tiere an den Boden gepreßt und durch wiederholte Aufschwemmungen mit abgestandenem Wasser gereinigt. Bei der zweiten Methode ging er so vor, daß er die Tiere auf Filtern abwusch; diese fingen sich in den Maschen des Filters und konnten so bequem abgespült und gereinigt werden. Durch Einstellen des Filters in reines Brunnenwasser gingen dann die gewaschenen Paramaecien allmählich wieder aus den Filtermaschen heraus.

Diese Versuche hatten das Resultat, daß nach beiden Arten der Trennung die photodynamische Wirkung noch eintrat.

Somit hatte er, zuwenigstens für die Paramaecien den Beweis erbracht, daß eine intracelluläre Wirkung möglich ist.

Nun gab aber der Umstand zu bedenken, daß diese Protozoen ein Peristomum besaßen, und es war fraglich, ob durch Osmose durch die Zellmembran, oder ob durch den Mund die fluorescierende Substanz in das Innere der Paramaecien gelangt war.

Es schien daher geraten, eine andere Zellart in dieser Richtung zu untersuchen, und H. v. Tappeiner jr. zog zu dieser Untersuchung die roten Blutkörperchen heran. Bei einer Reihe von fluoreszierenden Stoffen konnte er nachweisen, daß, auch wenn die

fluoreszierenden Stoffe nur im Innern der Zellen vorhanden waren, eine photodynamische Wirkung, die sich in der Auflösung der Erythrocyten (Haemolyse) zu erkennen gab, auftrat. Diese Wirkung war aber hiebei geringer als in dem Falle, bei welchem die Substanzen sich auch in der Außenlösung befanden.

Ich habe auf Anregung Professor v. Tappeiners ebenfalls die roten Blutkörperchen zu meinen Versuchen benutzt.

Es lag ihnen zu Grunde, einerseits die vorliegende Fragestellung, andererseits sollten vor allem über den zeitlichen Verlauf der durch die fluoreszierenden Stoffe eintretenden Haemolyse Aufschlüsse erhalten werden. Insbesondere war auch festzustellen, ob Unterschiede des zeitlichen Verlaufes eintreten, falls die wirksamen Stoffe nur innerhalb der Zelle, oder innerhalb und außerhalb der Zelle sich befinden.

Ueber die photodynamische Wirkung auf rote Blutkörperchen haben schon Sacharoff und Sachs ausgedehnte Untersuchungen angestellt. Sie bestätigten in allen wesentlichen Punkten die schon von v. Tappeiner und Jodlbauer an Paramäcien gemachten Beobachtungen.

Die Versuchsanordnung entsprach bei den Versuchen von Sacharoff und Sachs der sonst bei haemolytischen Versuchen gebräuchlichen. In einer Reihe von Reagenzgläschen wurden fallende Mengen des Farbstoffes verteilt und mit einer 5prozentigen Kaninchen-

blut-Kochsalzaufschwemmung vermischt. Diese Röhrchen wurden 2 Stunden dem direkten Sonnenlichte ausgesetzt und zu gleicher Zeit eine Kontrollösung im Dunkeln gehalten. Es zeigte sich bei einem Versuche mit Eosin (Tetrajodfluoreszeïn), daß 0,00075 ccm einer 1 prozentigen Lösung unter dem Einflusse des Sonnenlichtes noch imstande sind, 1 ccm 5prozentigen Kaninchenblutes vollständig aufzulösen, während im Dunkeln selbst die 1300fache Menge jedweder haemolytischer Wirksamkeit entbehrt.

Sacharoff und Sachs untersuchten nun eine große Reihe dieser fluoreszierenden Farbstoffe und teilten dieselben in zwei Gruppen:

I. Solche Farbstoffe, die im Dunkeln überhaupt nicht oder nur spurweise haemolytisch wirken und nur auf photodynamischem Wege die Haemolyse verursachen;

II. solche Farbstoffe, die zwar im Dunkeln schon haemolytisch wirken, aber auf photodynamischem Wege in ihrer haemolytischen Kraft erheblich gesteigert werden.

Was v. Tappeiner und Jodlbauer schon für die Protozoen bestätigt haben, fand Sacharoff und Sachs auch bei den roten Blutkörperchen wieder; nämlich daß keineswegs die am stärksten fluoreszierenden Substanzen die größte haemolytische Kraft besitzen, sondern in ihrer Wirkung meist umumgekehrt proportional sich verhalten. Dies hängt damit zusammen, daß nicht das ausgesandte Fluoreszenzlicht, sondern die vom

fluoreszierenden Stoffe absorbierte strahlende Energie das Maßgebende ist.

Ueber die Notwendigkeit der Anwesenheit von Sauerstoff haben die Versuche ebenfalls einwandfreie Resultate ergeben. So konnte durch Zusatz eines Sauerstoffängers die Haemolyse durch Erythrosin (Tetrabromfluoreszeïn) im Sonnenlicht vollständig unterdrückt werden.

II. VERSUCHSANORDNUNG.

Den von mir unternommenen neuerlichen Sensibilisierungsversuchen an roten Blutkörperchen lag, wie bereits erwähnt, die gleiche Fragestellung zugrunde wie den Osthelder'schen Versuchen mit Paramaecien: nämlich den Angriffspunkt der fluoreszierenden Farbstoffe festzustellen. Zu diesem Zwecke ist das Eosin, das dichloranthracendisulfonsaure Natrium und das Phenosafraninchlorid zur Untersuchung herangezogen worden.

Es kam zunächst wieder darauf an, die fluoreszierende Substanz, nachdem sie im Dunkeln eine Zeitlang auf die Zellen der roten Blutkörperchen eingewirkt hatte, von letzteren zu trennen, um damit eine Außenwirkung völlig auszuschließen.

Eine 1prozentige, defibrinierte Ochsenblut-Lösung wurde zunächst durch wiederholtes Centrifugieren und Aufschwemmen mit physiologischer Kochsalz-Lösung (0,9%) gewaschen. Das sorgfältige Freiwaschen der roten Blutkörperchen vom Serum ist

aus dem Grunde notwendig, da das Serum nach den Versuchen von Busck die photodynamische Wirkung der fluoreszierenden Stoffe sehr stark hemmt, was wohl auf eine lockere Bindung dieser Stoffe mit den Eiweißstoffen des Serums — Adsorption — beruht. Nach dem Waschen wurden den roten Blutkörperchen zu gleichen Teilen die zu untersuchenden Substanzen im Dunkelzimmer beigemengt. Sodann blieb das Gemenge meistens 1 Stunde lang dort stehen, um dem Eindringen der zugesetzten Stoffe genügend Zeit zu lassen. Diese Lösungen, Blut + fluoreszierende Substanz, werden nun wiederum in die Centrifuge gebracht. Von den zu Boden gedrückten Blutkörperchen-Sediment wird die darüber befindliche Flüssigkeit abgegossen und mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt. Dieser Proceß wurde solange wiederholt, bis in der Lösung keine Farbe, respektive keine Fluoreszenz mehr zu beobachten war. Somit ist eine Blutkörperchen - Aufschwemmung gewonnen worden, in der eine Außenwirkung der fluoreszierenden Substanz ausgeschlossen ist. Wenn jetzt photodynamische Wirkung auftritt, so kann dieselbe nur im Innern der roten Blutkörperchen vor sich gehen.

Zum Zwecke einer intensiven Belichtung war eine Kohlenbogenreflektorlampe von 30 Ampères, 110 Volt aufgestellt worden. Die Intensität dieser Lichtquelle (im grünen Teile) kommt jener direkten Wintersonnenlichtes nahe, wie sich durch einige, früher im Institute

vorgenommene vergleichende Versuche mit Jodkalium oder Invertin + Eosin als chemisches Photometer gezeigt hatte; indessen ist das Licht kein völlig konstantes, da es von der wechselnden Beschaffenheit der Kohlen, ihrem gegenseitigen Abstande und manchem anderen abhängig ist. Der Reflektor-Hohlspiegel der Lampe bestand aus Magnaliumlegierung und hatte einen Durchmesser von 30 cm. Der Reflektor war so gestellt, daß die reflektierten parallelen Strahlen zur Achse zunächst durch ein von Wasser durchströmtes Kühlgefäß mit planparalleler Glaswandung (Zeiß, Jena) gingen und nach Passierung eines zweiten, mit stehendem Wasser gefüllten Bassins mit ebenfalls planparalleler Wandung auf eine Scheibe trafen, die mit den Versuchsröhrchen beschickt war. Es ist auf diese Weise gelungen, in den Röhrchen eine Temperatur zu erzeugen, die die Körperwärme nicht übertrifft. Diese Drehscheibe von ebenfalls 30 cm Durchmesser stand senkrecht auf der optischen Achse der Kohlenreflektorbogenlampe und wurde durch eine direkt an der Wasserleitung befestigte Wasserturbine so in Gang gesetzt, daß sie in der Minute ca. 25 Umdrehungen machte. Durch diese Rotation wurde einerseits die Mischung mit Sauerstoff bewirkt, andererseits dafür Sorge getragen, daß die Erythrocyten sich nicht am Boden festsetzten, sowie durch die fortwährende Bewegung alle Teile der Mischung die gleiche Lichtmenge empfingen. Die Scheibe war derart montiert, daß sie Platz

bot für 12 Reagenzröhrchen, welche radiär, in schmalen Messingösen darauf befestigt waren. Die Röhrchen selbst waren aus dünnem Jenaer Glas, welches durch seinen geringen Gehalt an Alkali, im Gegensatz zu gewöhnlichen Glassorten, verschiedene Störungen vermied. Die Röhrchen, welche einen Durchmesser von 11 mm und eine Höhe von 12 cm besaßen, waren mit je 10 ccm der Versuchsflüssigkeit angefüllt.

Da nicht allein die Zeit bestimmt werden sollte, welche zu einer totalen Haemolyse führte, sondern vielmehr die feineren Vorgänge bei der Auflösung studiert werden sollten, wurden von jeder zu untersuchenden Probe eine größere Anzahl von Reagenzgläsern (meistens zwölf) gleichzeitig auf dem Rade belichtet; sodann wurde in bestimmten Zeitintervallen je ein Glas abgenommen und ins Dunkle zurückgebracht. Die destruierende Wirkung des Lichtes wurde nun auf zwei Weisen zu eruieren gesucht; einerseits durch Bestimmung des Volumens der noch erhaltenen Blutzellen, indem die Lösungen in einem Haematokriten centrifugiert wurden, andererseits durch spektroskopische Bestimmung des ausgelaugten Blutfarbstoffes. Letzteres geschah so, daß die Lösungen soweit verdünnt wurden, bis der bei D gelegene Absorptionsstreifen des Oxyhaemoglobins gerade verschwand.

In der verwendeten 5prozentigen*) Auf-

*) Die obige Concentration von 5% bezieht sich auf die stets verwendeten, vom Blutserum befreiten Blutauf-

schwemmung von roten Blutkörperchen konnte, nachdem eine vollständige Auflösung der Erythrocyten herbeigeführt war, eine 18fache Verdünnung gemacht werden, bis das Verschwinden des zweiten Absorptionsstreifens eintrat. Somit bei beispielsweiser Untersuchung von 5 ccm obiger Blutkörperchenconcentration eine Verdünnung auf 90 ccm.

III. EIGENE VERSUCHE.

Versuche mit Eosin.

a) Eosin befindet sich innerhalb und außerhalb der Zellen.

Versuch I. Eine 10proz. Aufschwemmung von roten Blutkörperchen (Ochsenblut) wird, nachdem sie vom Serum freigewaschen ist, mit einer Eosinlösung 1:2500 — n āā versetzt. Das Gemenge wird zwei Stunden im Dunkelzimmer aufbewahrt und dann in 12 Reagenzröhrchen zu je 10 ccm verteilt. Die Reagenzgläser werden in der oben angegebenen Weise auf der Drehscheibe befestigt und mit der Kohlenbogenreflektorlampe belichtet. In Intervallen von je 2 Minuten wird je ein Röhrchen entfernt und in das Dunkelzimmer zurückgebracht.

Um nun den Grad der photodynamischen

---

schwemmungen. Da durch das Centrifugieren stets eine, wenn auch geringe Menge von Zellen verloren geht, wird die wahre Concentration etwas unter der oben angegebenen Zahl zu liegen kommen.

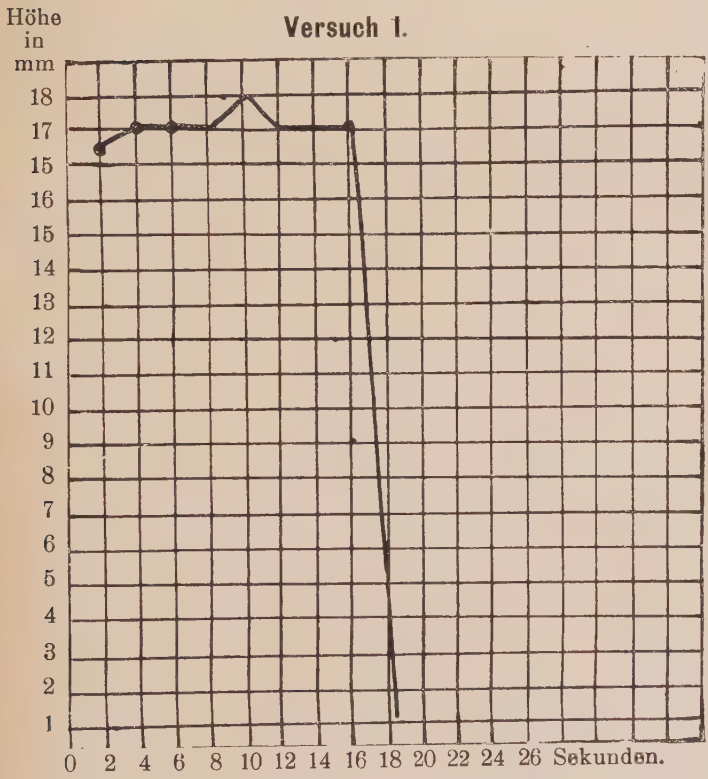
Wirkung in den einzelnen Belichtungszeiten zu eruieren, wird in den Haemokriten das Volumen der noch nicht gelösten Blutkörperchen bestimmt. Die folgenden Zahlen beziehen sich auf die Höhe der nach 30 Minuten Centrifugieren abgesetzten Blutkörperchensäule in Millimetern. Die Höhe beträgt

nach	2	Minuten	— 16,5 Millimeter
„	4	„	— 17,0 „
„	6	„	— 17,0 „
„	8	„	— 18,0 „
„	10	„	— 17,0 „
„	12	„	— 17,0 „
„	14	„	— 17,0 „
„	16	„	— 17,0 „
„	18	„	— 0 „
„	20	„	— 0 „
„	22	„	— 0 „
„	24	„	— 0 „

Wenn man das gefundene Resultat auf einer Kurve darstellt, so sieht man, daß eine ziemlich lange Zeit verstreicht, während welcher keine Abnahme des Volumens der roten Blutkörperchen zu beobachten ist. Sodann tritt sehr plötzlich die vollständige Auflösung derselben ein.

Stellt man sich die Beschaffenheit der roten Blutkörperchen so vor, daß eine lipoide Membran das Haemoglobin einschließt, so drängt sich die Vermutung auf, daß eine bestimmte Belichtungszeit notwendig ist, diese Membran zu schädigen, respektive aufzulösen, und daß danach das Haemoglobin auf einmal

in die Außenlösung tritt. Wäre diese Vorstellung richtig, so müßte derselbe steile Verlauf der Kurve eintreten, wenn eine schwächere Concentration des Eosins verwendet wird und



hierdurch der photodynamische Effekt langsamer sich einstellt.

Es wurde zu diesem Zweck derselbe Versuch wiederholt, nur mit der Aenderung, daß

anstatt 1:5000—n Eosinlösung 1:50000—n verwendet wurde.

Versuch II. Es wurde eine 10prozentige Aufschwemmung roter Blutkörperchen mit 1:25000—n Eosin āā vermischt, so daß nach der Mischung die Menge der Erythrocyten 5% betrug, mit einem Gehalt von 1:50000—n Eosin. Das Gemenge wurde 2 Stunden im Dunkelzimmer aufbewahrt und dann zu je 10 ccm in 6 Reagenzröhrchen verteilt. Die Reagenzgläser wurden auf der drehbaren Scheibe befestigt und zunächst einer 21 Minuten langen ununterbrochenen Belichtung ausgesetzt. Darauf wurde in Intervallen von jedesmal 12 Minuten je ein Röhrchen entfernt und ins Dunkelzimmer zurückgebracht. Um den Grad der Haemolyse in den einzelnen Gläsern zu eruieren, wird durch Centrifugieren das Volumen der noch nicht aufgelösten roten Blutzellen im Haematokriten bestimmt. Das Resultat ist folgendes:

Höhe der Blutkörperchensäule		
nach 21 Minuten	30,5	Millimeter
„ 33 „	30,5	„
„ 45 „	21,0	„
„ 57 „	6,5	„
„ 1 Std. 9 Min.	4,5	„
„ 1 „ 21 „	3,0	„

Nach diesem Ergebnis ist es klar, daß die bei der vorigen Eosinconcentration eingetretene plötzliche Haemolyse nur scheinbar ist. Wäre statt alle 2 Minuten vielleicht alle

$^1/_4$ Minuten eine Untersuchung angestellt worden, so wäre das Ergebnis wohl das gleiche gewesen wie im vorliegenden Versuche.

Das gleiche Resultat, wie die Bestimmung der Höhe der Erythrocytensäule gibt die Bestimmung des ausgetretenen Haemoglobins in der Außenlösung. Die folgende Tabelle gibt die Menge von Wasser an, welche zu 5 ccm abpipettierter Außenlösung zugesetzt werden mußte, um den 2. Streifen des Oxyhaemoglobins bei D eben zum Verschwinden zu bringen.

Zu 5 ccm Lösung nötige Wassermenge:

nach	21	Minuten	5 ccm
„	33	„	10 „
„	45	„	30 „
„	57	„	65 „
nach	1 Std. 9	Min.	85 ccm
„	1 „ 21	„	95 „

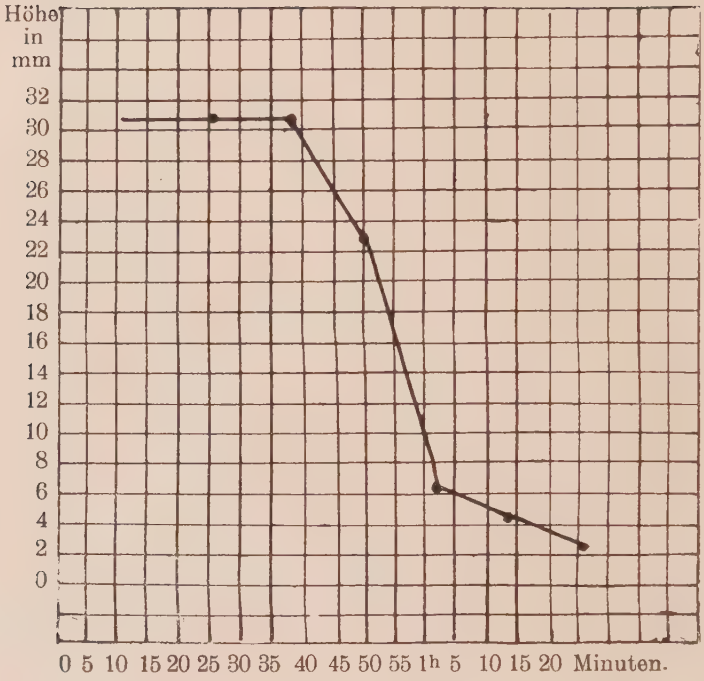
Zur besseren Uebersicht dienen nachstehende graphische Darstellungen:

(Abbildungen (a) und (b) siehe Seite 20 und 21.)

b) Eosin befindet sich nur innerhalb der Zellen.

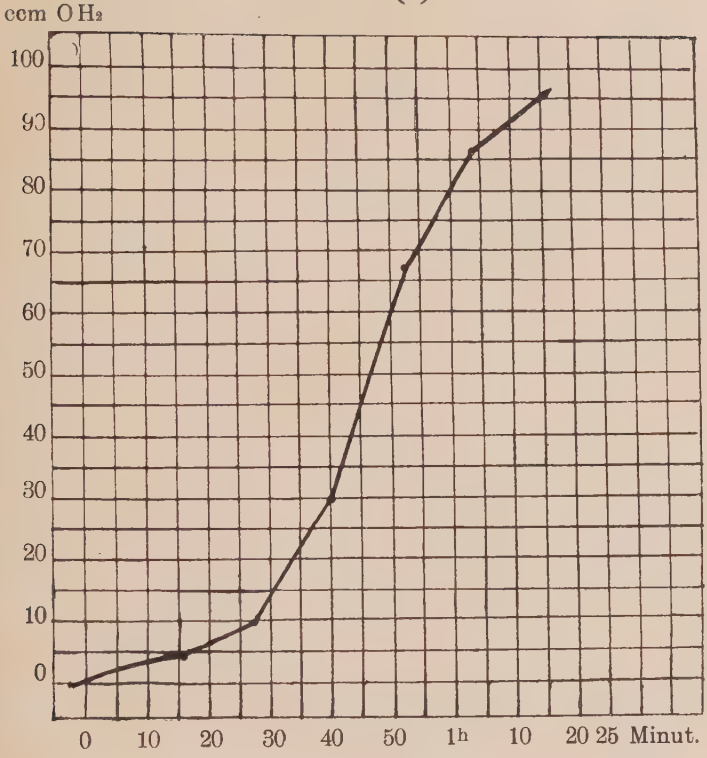
Versuch III. Eine 10prozentige Aufschwemmung von roten Blutkörperchen wurde mit 1:1000—n Eosin vermischt und 2 Stunden im Dunkelzimmer aufbewahrt. Das Gemenge (5proz. Blutaufschwemmung + 1:2000 —n Eosin) wurde zu je 10 ccm in 6 Reagenzgläser verteilt. Die Röhrchen, auf der Drehscheibe befestigt, werden zunächst einer un-

Versuch II(a).



unterbrochenen Belichtung von 30 Minuten ausgesetzt und sodann in Zeitintervallen von je 20 Minuten entfernt und ins Dunkelzimmer verbracht. Zur Bestimmung des Grades der eingetretenen Haemolyse wird auf die eingangs erwähnten beiden Methoden zurückgegriffen. Nach Centrifugierung im Haematokriten beträgt die Höhe des Erythrocytensedimentes:

Versuch II (b).



nach	50	Minuten	33,0 mm
„	70	„	28,5 „
„	90	„	25,0 „
„	110	„	24,0 „
„	130	„	20,0 „
„	150	„	13,0 „

Die Bestimmung des in die Außenlösung

ausgetretenen Haemoglobins gibt ein gleiches Ergebnis. In der folgenden Tabelle ist die Menge von Wasser angegeben, welche zu 5 ccm abpipettierter, von Erythrocyten freier Außenlösung zugesetzt werden mußte, um den zweiten Streifen des Oxyhaemoglobins bei D gerade zum Verschwinden zu bringen.

Zu 5 ccm Lösung nötige Wassermenge			
nach	50	Minuten	(keine Haemolyse)
„	70	„	5 ccm
„	90	„	15 „
„	110	„	35 „
„	120	„	60 „
„	150	„	80 „

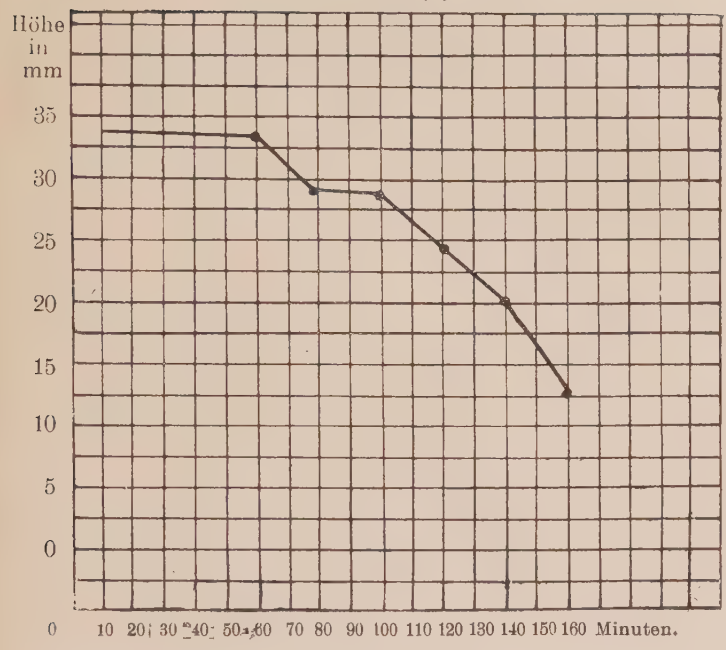
Diese Ergebnisse sind in folgenden Kurven klargelegt:

(Abbildung siehe Seite 23 und 24.)

B. Versuche mit dichloranthracendisulfonsaurem Natrium.

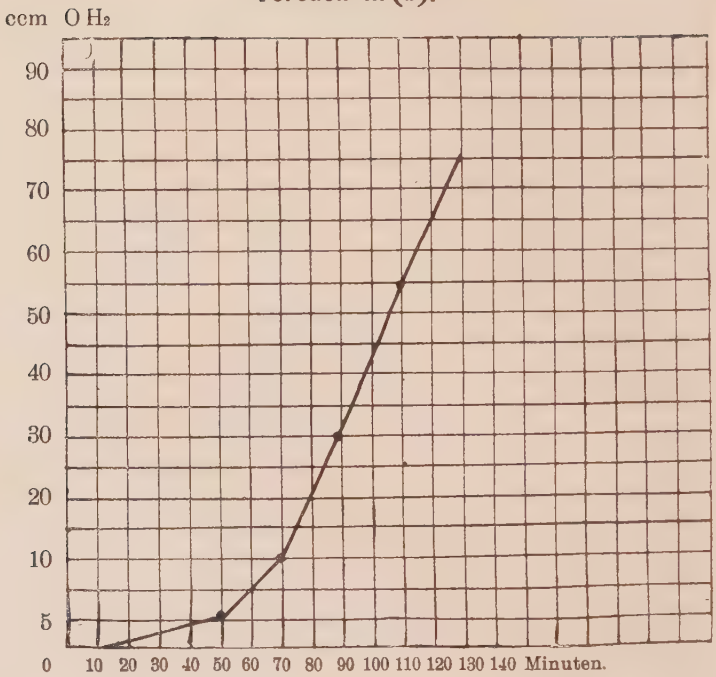
a) Dichloranthracendisulfonsaures Natrium befindet sich innerhalb und außerhalb der Zellen.

Versuch I. Eine 5prozent. Aufschwemmung von roten Blutkörperchen (Ochsenblut) wird vom Serum freigewaschen und mit einer Lösung von dichloranthracendisulfonsaurem Natrium 1 : 2500 — n āā versetzt. Das Gemenge wird 1 Stunde im Dunkeln aufbewahrt und dann zu je 10 ccm in 6 Reagenzgläser verteilt. In der bekannten, eingangs schon erwähnten Weise werden diese Röhrchen der Belichtung



ausgesetzt. Nach einer ununterbrochenen Belichtung von 1 Stunde 20 Minuten wird in Zeitintervallen von je 20 Minuten ein Röhrchen entfernt und ins Dunkelzimmer verbracht. Um nun wiederum den Grad der eingetretenen photodynamischen Wirkung zu ermitteln, wird in den Haematokriten das Volumen der noch nicht gelösten Erythrocyten bestimmt. Die folgende Tabelle zeigt uns die Zahlen, welche sich auf die Höhe der nach 30 Minuten langem Centrifugieren abgesetzten Blutkörperchensäule in Millimetern beziehen.

Versuch III (b).



Höhe des Erythrocytensedimentes

nach	1	Stunde	40 Minuten	16,5 mm
„	2	Stunden		12,25 „
„	2	„	20 Minuten	8,5 „
„	2	„	40 „	6,0 „
„	3	„		4,5 „
„	3	„	20 „	4,0 „

Wie beim Eosin, so zeigt sich auch bei diesem Körper, daß die Haemolyse nicht mit einem Schlage erfolgt, sondern eine allmählich sich entwickelnde ist. Eine weitere Bestäti-

gung dieses Resultates gibt uns die zweite Untersuchungsmethode, nämlich die Bestimmung des in die Außenlösung ausgetretenen Haemoglobins. Es kann wiederum auf einer Tabelle veranschaulicht werden, welche Menge Wasser zu 5 ccm abpipettierter, von den Erythrocyten befreiter Außenlösung zugesetzt werden mußte, um den bei D gelegenen zweiten Streifen des Oxyhaemoglobins gerade zum Verschwinden zu bringen.

Zu 5 ccm Lösung nötige Wassermenge

nach	1	Stunde	40	Minuten	15	ccm
„	2	Stunden			30	„
„	2	„	20	Minuten	50	„
„	2	„	40	„	65	„
„	3	„			80	„
„	3	„	20	„	85	„

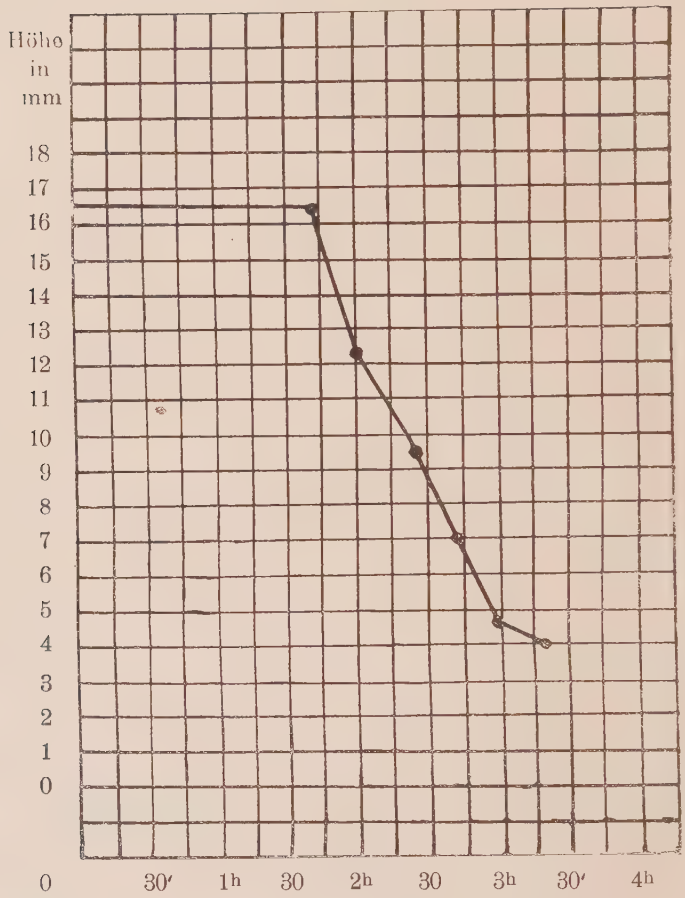
In graphischer Darstellung ergibt sich folgendes Resultat:

(Abbildungen siehe Seite 26 und 27.)

b) Dichloranthracendisulfonsaures Natrium befindet sich nur innerhalb der Zellen.

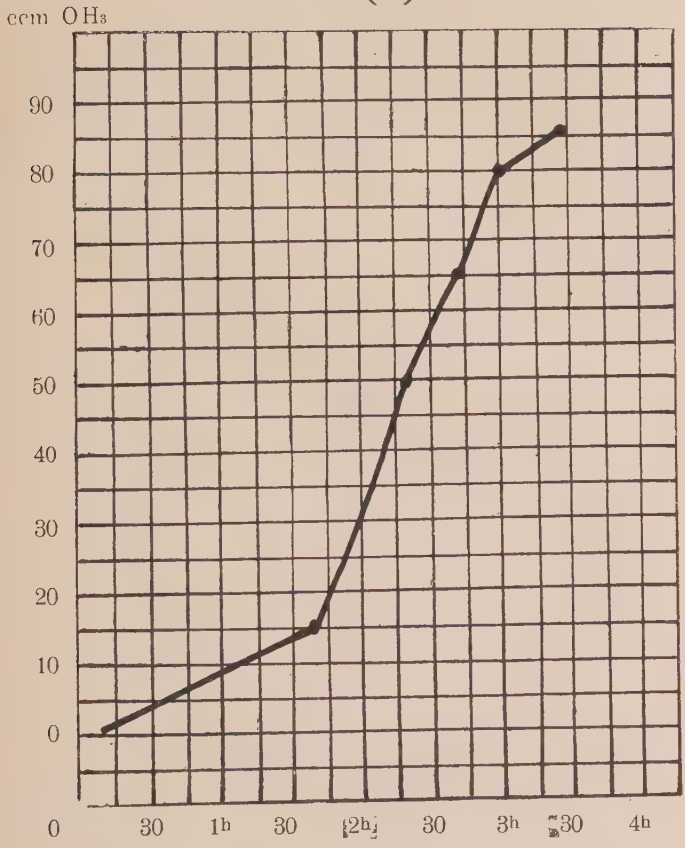
Versuch II. Eine 10prozent. Aufschwemmung roter Blutkörperchen wird, nachdem sie vom Serum freigewaschen ist, mit einer Lösung von dichloranthracendisulfonsaurem Natrium 1:2000 — n āā versetzt. Das Gemenge wird, um dem Eindringen des gelösten Körpers

Versuch I (a).



in die Erythrocyten genügend Zeit zu lassen, 2 Stunden im Dunkelzimmer aufbewahrt. Um nun das dichloranthracendisulfonsaure Natrium wieder von der Außenlösung zu trennen, wird die Mischung in die Centrifuge gebracht

Versuch (1b).



und die über dem Sediment befindliche Lösung solange abgegossen und mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt, bis keinerlei Fluoreszenz mehr sichtbar ist. Von den Erythrocyten, in welche das dichloranthracendisulfonsaure Natrium eingedrungen ist, wird mit phy-

siologischer Kochsalzlösung eine Aufschwemmung hergestellt, so daß das frühere Volumen wieder erreicht wird. Es werden je 10 ccm der Aufschwemmung in 6 Reagenzröhrchen verteilt und in der schon öfter erwähnten Weise belichtet. In diesem Falle geht eine ununterbrochene Belichtung von 2 Stunden voraus, sodann werden in Pausen von je 40 Minuten die Röhrchen entfernt. Im Haematokriten wird der Grad der eingetretenen photodynamischen Wirkung in den einzelnen Zeitintervallen durch die Höhe des Blutkörperchensediments bestimmt, und ergibt, auf Tabellen angeordnet, folgendes Resultat:

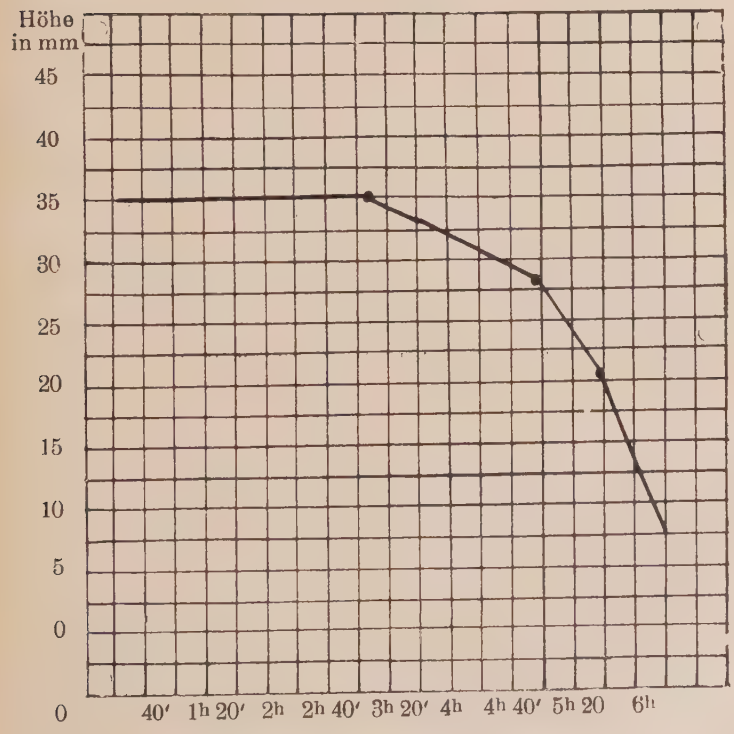
Höhe des Erythrocytensediments					
nach	2	Stunden	40	Minuten	35,0 mm
„	3	„	20	„	33,5 „
„	4	„			31,5 „
„	4	„	40	„	28,0 „
„	5	„	20	„	20,0 „
„	6	„			7,5 „

Das entsprechende Resultat zeigt sich bei Bestimmung der Menge des in die Außenlösung ausgetretenen Haemoglobins. Die Wassermenge, welche zugesetzt werden muß, um den zweiten Streifen des Oxyhaemoglobins bei D im Spektroskop zum Verschwinden zu bringen, wird auf der folgenden Tabelle in den einzelnen Zeitintervallen dargestellt und in Cubiccentimetern bestimmt.

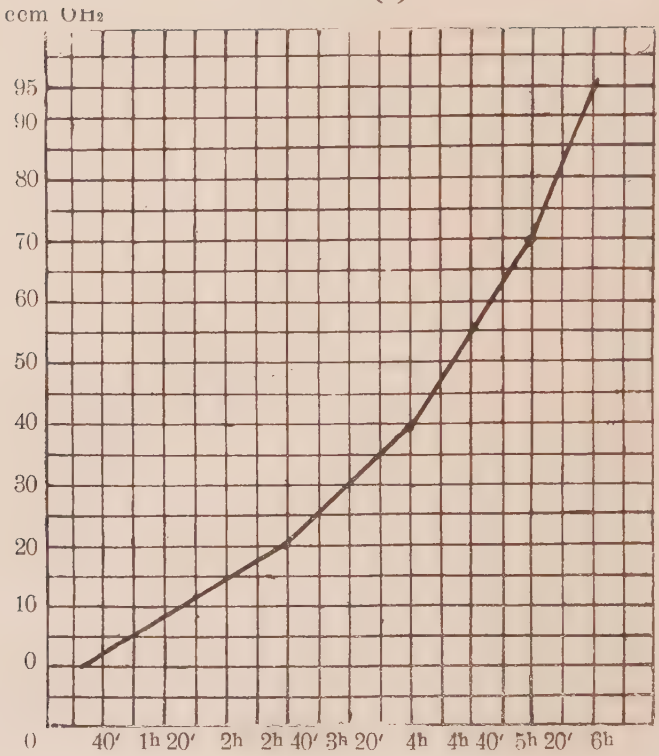
Zu 5 ccm Lösung nötige Wassermenge						
nach	2	Stunden	40	Minuten	20	ccm
„	3	„	20	„	30	„
„	4	„			40	„
„	4	„	40	„	55	„
„	5	„	20	„	70	„
„	6	„			95	„

Um eine bessere Uebersicht zu gewähren, lassen sich diese Versuche auf den folgenden Kurven graphisch darstellen:

Versuch II (a).



Versuch II (b).



Wie in früheren Versuchen von H. v. Tappeiner jr., zeigten auch meine Versuche, daß die beiden untersuchten Körper, auch wenn sie nur im Innern der Zelle vorhanden waren, photodynamische Wirkung entfalteten. Ein Unterschied des zeitlichen Ablaufes der Haemolyse zwischen Außenwirkung (photodynamische Substanz außerhalb und innerhalb der

Zellen) und Innenwirkung (photodynamische Substanz nur innerhalb der Zellen) konnte nicht festgestellt werden. Nach einer bestimmten Zeit, während welcher keine sofort wahrnehmbaren Veränderungen der roten Blutkörperchen beobachtet werden konnten (Inkubationsperiode), setzte die Haemolyse allmählich ein und wurde erst nach längerer oder kürzerer Zeit vollständig.

Da die zwei, im vorhergehenden untersuchten Stoffe Salze organischer Säuren sind, war es von Interesse, einen Körper basischer Natur hier noch genauer zur Untersuchung heranzuziehen, und es wurde hierzu das Phenosafranin gewählt.

C. Versuche mit Phenosafranin.

Mit diesem Körper wurde nur festgestellt, inwieweit derselbe in die roten Blutkörperchen einzudringen und im Zellinnern photodynamische Wirkung zu entfalten vermag. Vor den eigentlichen Versuchen galt es festzustellen, welche Concentration des Phenosafranins den roten Blutkörperchen zugesetzt werden darf, ohne daß schon im Dunkeln eine nennenswerte Einwirkung (Giftwirkung) stattfindet.

Zu diesem Zwecke wurde eine 1 prozentige Blutkörperchenaufschwemmung mit 1:200-, 1:500-, 1:1000-, 1:2500-, 1:5000-, 1:10 000 und 1:25 000-mol versetzt. Nach 24 stündiger Einwirkung im Dunkeln war in keiner dieser Pro-

ben Haemolyse zu ersehen. Der eigentliche Versuch wurde nun in folgender Weise angestellt.

Eine 1 proz. Blutaufschwemmung wurde mit verschiedenen Concentrationen der zu untersuchenden Substanz versetzt. Die Gemenge wurden dann 2 Stunden im Dunkeln aufbewahrt und jede Portion in 2 gleiche Teile geteilt. Der eine Teil blieb weiter im Dunkelzimmer, während der andere in die Centrifuge gebracht wurde, um die phenosafraninhaltigen Blutkörperchen von der Außenlösung zu trennen. Während bei den vorher untersuchten Körpern im allgemeinen ein fünfmaliges Centrifugieren genügte, um jeden Farbstoff, respektive jedes Auftreten von Fluoreszenz aus der Außenlösung zu entfernen, gelang dies hier selbst nach zehnmaligem Centrifugieren nicht vollständig. Dieser Umstand mag damit zusammenhängen, daß einerseits sehr große Mengen Phenosafranin in die roten Blutkörperchen eindringen, und auch der Austritt in die phenosafraninfreie Außenlösung sehr rasch erfolgt. Trotzdem somit die Auswaschung in den drei höchsten Concentratinen nicht vollständig gelang,*) wurde mit der Belichtung begonnen. Zu diesem Zwecke wurden wie bisher je 10 ccm sowohl der centrifugierten, wie der nichtcentrifugierten Proben in die

---

*) Der Gehalt an Phenosaphranin war nach dem Centrifugieren in der Concentration $^1/_{200}$: $^1/_{100\,000}$ mol; $^1/_{5000}$: $^1/_{200\,000}$ mol; $^1/_{2000}$: $^1/_{1000\,000}$ mol.

Jenaer Gläschen gebracht und die Belichtungszeit festgestellt, die nötig war, bis totale Haemolyse auftrat.

Auf der folgenden Tabelle wird der Eintritt der Haemolyse sowohl in phenosafraninfreier wie phenosafraninhaltiger Außenlösung zeitlich dargestellt.

a) Phenosafranin außerhalb und innerhalb der Zellen.

1.	1:200	nach	75	Minuten
2.	1:500	„	55	„
3.	1:2000	„	40	„
4.	1:5000	„	65	„
5.	1:20000	„	80	„
6.	1:100000	„	115	„

b) Phenosafranin innerhalb der Zellen.

	Concentration	Eintritt d. Haemolyse		
3.	1:2000	nach	90	Minuten
4.	1:5000	„	70	„
5.	1:20000	„	60	„
6.	1:100000	„	95	„
7.	1:500000	„	110	„
8.	1:2000000	„	125	„

Bevor ich auf die Deutung der hierbei gefundenen Zahlen eingehe, möchte ich angeben, wie hoch die Concentration des Phenosafranins innerhalb der roten Blutkörperchen bei der zuletzt angegebenen Versuchsreihe war. Zu diesem Zwecke wurden 40 ccm jeder Concentration, die nicht zur Belichtung benutzt wurden, mehrere Tage im Dunkeln stehen gelassen und sodann die abcentrifugierte Lösung auf

ihren Gehalt an Phenosafranin colorimetrisch untersucht. Derselbe entsprach

in 1 1:25000-mol
„ 2 1:50000-mol
„ 3 1:200000-mol

Nun ist zu überlegen, daß geringe Mengen von Phenosafranin bereits in der Außenlösung vorhanden waren (wie in der vorhergehenden Anmerkung angegeben). Es ist somit die wirkliche Concentration des aus den Erythrocyten ausgetretenen Farbstoffes

in 1 3:100000-mol
„ 2 3:200000-mol
„ 3 6,5:500000-mol

Nimmt man das Volumen der roten Blutkörperchen im Rinderblut zu 40% an, so beträgt das Volumen der roten Blutkörperchen in der verwendeten 5 proz. Aufschwemmung 2,0 ccm. Es sind somit die oben angegebenen Mengen Phenosafranin in je 2 ccm enthalten und das entspräche

in 1 0,00098 g
„ 2 0,00048 g
„ 3 0,00031 g

oder prozentual

in 1 0,045
„ 2 0,024
„ 3 0,016

oder molekular ausgedrückt wäre der Phenosafraningehalt

in 1 1,4:1000
„ 2 7,5:10000
„ 3 5,0:10000

Somit ist auch für diesen basischen Körper festgestellt, daß die Möglichkeit besteht, daß die im Innern der Zelle befindliche fluoreszierende Substanz photodynamisch wirkt; denn die geringen Mengen von Phenosafranin in der Außenlösung würden eine längere Belichtung bis zum Eintritt der Haemolyse benötigt haben. Vor allem möchte ich bei diesem Versuche auch hervorheben, daß die Haemolyse bei Verwendung der Concentration 1 : 2000 — n, trotzdem die Außenlösung abcentrifugiert war, noch rascher eintrat als in der Optimalconcentration des Versuches, bei dem das Phenosafranin sich außerhalb und innerhalb der Zellen befand. Dies erklärt sich wohl auf die Weise, daß, falls das Phenosafranin sich in der Außenlösung befindet, sehr viel Licht von der Lösung absorbiert wird, ohne an die Blutkörperchen zu gelangen. In dem anderen Falle hingegen, bei welchem der Körper größtenteils nur innerhalb der Zellen ist, kann sämtliches Licht auf die roten Blutkörperchen einwirken. Auf ähnliche Weise läßt es sich auch erklären, daß in dem Versuche — Phenosafranin außerhalb und innerhalb der Zellen — das Optimum der Wirkung bei 1 : 20000 liegt und die photodynamische Wirkung durch Erhöhung der Concentration abnimmt. Auch hier wird es sich um Absorption von Licht handeln, ohne daß dasselbe in eine, die roten Blutkörperchen schädigende Energie umgewandelt wird.

Die bei Eosin und dichloranthracendisulfonsaurem Natrium gegebenen Darstel-

lungen könnten den Anschein erwecken, als bedürfe es einer ziemlich langen Zeit, bis eine Wirkung des Lichtes + fluoreszierende Substanz eintritt. Es wurde deshalb stets vorsichtigerweise der Ausdruck gewählt, daß bei der anfänglichen Belichtung keine „sogleich wahrnehmbare" Wirkung vorhanden ist. Daß aber eine solche durchaus nicht fehlt, erkennt man folgendermaßen:

Wird eine rote Blutkörperchenaufschwemmung nur solange belichtet, bis die Haemolyse eben beginnt, und dann eine Zeitlang im Dunkeln stehen gelassen, so wird schon nach kurzer Zeit die Haemolyse total. Dies macht es wahrscheinlich, daß auch bei äußerst kurzer Belichtungsdauer eine Veränderung der roten Blutkörperchen eintreten muß. In dem folgenden Versuche findet diese Annahme auch ihre Bestätigung. Fragen wir uns nach den Gründen dieser — sagen wir Nachwirkung —, so könnte die Ursache darin liegen, daß das Eosin, welches, wie schon erwähnt, in den zur Belichtung verwendeten Concentrationen auf intakte rote Blutkörperchen im Dunkeln ohne nachweisbare Wirkung ist, auf durch Belichtung veränderte Erythrocyten auch im Dunkeln schädigend wirken kann. Dies zu entscheiden, wurde folgender Versuch angestellt:

Eine 5 zrozent. Blutkörperchenaufschwemmung wurde mit 1 : 1000 — n Eosin āā versetzt. Nach 1 stündigem Stehen im Dunkeln wurden dann je 10 ccm des Gemenges in eine große Anzahl (36) Jenaer Gläser verteilt. Nach je

1 Minute wurden jedesmal 2 Röhrchen aus dem Lichte genommen und möglichst rasch in eine stark wirkende Centrifuge gebracht. Von den abcentrifugierten roten Blutkörperchen wurden die eosinhaltigen Außenlösungen abgegossen und dann das eine Röhrchen mit 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung, das andere mit der gleichen Menge 1:2000 — n Eosinlösung aufgefüllt. Es zeigte sich nun folgendes Resultat:

Belichtungsdauer in Minuten	Eintritt der Haemolye nach Stunden	
	in der Aufschwemmung mit Eosin	in der Aufschwemmung ohne Eosin
18, 17	nach 1 Stunde	nach 1 Stunde
16, 15	„ 2 Stunden	„ 2 Stunden
14, 13, 12, 11	„ 4 „	„ 4 „
10, 9	„ 7 „	„ 7 „
8, 7, 6, 5, 4, 3 (über Nacht)	„ 20 „	„ 20 „
2, 1	„ 23 „	„ 23 „

Somit ist an der Nachwirkung das Eosin in Form einer Dunkelwirkung nicht beteiligt. Die Ursache der Nachwirkung liegt also in der Schädigung durch das System fluoreszierende Substanz + Licht, und es ist deutlich ersichtlich, daß schon äußerst kurze Belichtungen zu einer Schädigung führen.

Fassen wir nun die Versuchsergebnisse der Arbeit nochmals zusammen, so ergibt sich folgendes:

I. Sowohl saure wie basische, fluoreszie-

rende Stoffe können innerhalb der Zellen (roter Blutkörperchen) photodynamisch wirken.

II. Die hierdurch bedingte Auflösung der roten Blutkörperchen setzt nicht mit einem Schlage ein, sondern die Haemolyse erfolgt ganz allmählich.

III. Der zeitliche Verlauf der Haemolyse erfolgt in derselben Weise, wenn der fluoreszierende Stoff sich nur innerhalb der Zellen befindet, oder wenn er innerhalb und außerhalb der Zellen ist.

IV. Die Optimalconcentration des Phenosafranins liegt bei stärkerer Verdünnung als der des Eosins und Methylenblaus, nämlich bei 1:20000 mol.

V. Phenosafranin wirkt, falls der Körper sich nur innerhalb der Zellen befindet, stärker photodynamisch, als wenn er innerhalb und außerhalb der Zellen ist.

Am Schlusse meiner Arbeit gestatte ich mir Herrn Prof. Dr. H. v. Tappeiner und Herrn Prof. Dr. A. Jodlbauer für die Ueberlassung der Arbeit und für die überaus liebenswürdige Unterstützung bei derselben meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Literatur-Verzeichnis.

1. H. v. Tappeiner: Zur Kenntnis der lichtwirkenden Stoffe. Deutsche med. Wochenschrift 1904. Nr. 16.
2. O. Raab: Ueber die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Paramaecien. Zeitschr. f. Biologie 39. 524. 1899.
3. A. Jodlbauer und H. v. Tappeiner: Ueber die Wirkung der photodynamischen Stoffe auf Protozoen und Enzyme. Deutsch. Archiv f. klin. Med. 80. 427. 1904.
4. G. Busck und H. v. Tappeiner: Ueber die Lichtbehandlung blutparasitärer Krankheiten. Deutsch. Archiv f. klin. Med. 87. 98. 1906.
5. A. Jodlbauer und H. v. Tappeiner: Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Spalt- und Fadenpilze. Deutsch. Archiv f. klin. Med. 84. 529. 1905.
6. R. Jakobson: Ueber die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Flimmerepithel. Zeitschr. f. Biologie 41. (N. F. 23) 444.
7. Sacharoff und Sachs: Ueber die haemolytische Wirkung der photodynamischen Stoffe. Münch. med. Wochenschrift Nr. 7. 1905.
8. H. Salvendi: Ueber die Wirkung der photodynamischen Substanzen auf weisse Blutkörperchen. Deutsch. Archiv f. klin. Med. 87. 356. 1906.
9. Ledoux-Lebard: Action de la lumière sur la toxicité de l'éosine et de quelques autres substances. Annal. de l'Inst. Pasteur. 16. 587. 1902.
10. A. Jodlbauer und H. v. Tappeiner: Ueber die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Toxine. Deutsch. Archiv f. klin. Med. 185. 399. 1905.

11. A. Jodlbauer und H. v. Tappeiner: Die Beteiligung des Sauerstoffes bei der Wirkung fluoreszierender Stoffe. Deutsch. Archiv f. klin. Med. 82. 520. 1905.
12. A. Jodlbauer und H. v. Tappeiner: Ueber die Beteiligung des Sauerstoffes bei der photodynamischen Wirkung. Münch. med. Wochenschrift Nr. 26. 1904.
13. Osthelder: Ueber die Wirkung photodynamischer Stoffe auf Paramaecien. Dissertation aus dem pharmakol. Institut München. 1907.
14. H. v. Tappeiner jun.: Wo liegt der Angriffspunkt fluoreszierender Substanzen auf rote Blutkörperchen. Dissertation aus dem pharmakol. Institut München. 1908.
15. A. Jesionek und H. v. Tappeiner: Die Behandlung der Hautkarzinome mit fluoreszierenden Stoffen. Deutsch. Archiv f. klin. Med. 82. 1905.
16. G. Busck: Die photobiologischen Sensibilisatoren und ihre Eiweissverbindungen. Biochem. Zeitschrift 1. 425. 1906.
17. A. Jodlbauer und H. v. Tappeiner: Ueber die Wirkung des Lichtes auf Enzyme in Sauerstoff- und Wasserstoffatmosphäre. Deutsch. Archiv f. klin. Med. 85. 386. 1905.